第29卷 第8期
2015 年 8 月

材 料 研 究 学 报
CHINESE JOURNAL OF MATERIALS RESEARCH

Vol. 29 No. 8
August 2015

不同铜含量钴铬合金的体外生物相容性

赵 昕[1,2,3,4] 曹 阳[1,2,3] 印 准[1,2,3] 张光平[5] 任伊宾[6] 战德松[1,2,3,4]

1. 中国医科大学口腔医学院修复二科 沈阳 110002
2. 中国医科大学口腔医学院中心实验室 沈阳 110002
3. 辽宁省口腔医学研究所 沈阳 110002
4. 辽宁省口腔疾病转化医学研究中心 沈阳 110002
5. 中国医科大学附属盛京医院口腔科 沈阳 110011
6. 中国科学院金属研究所 沈阳 110016

摘 要 用CCK-8法和Annexin-V/PI双标记法研究了不同铜含量(质量分数, 下同)的钴铬合金和钴铬合金的体外生物相容性(包括L929细胞增殖和凋亡)的影响。结果表明, 4种合金的体外生物相容性按含1%铜的钴铬合金、含2%铜的钴铬合金、钴铬合金、含3%铜的钴铬合金的顺序递减; 其细胞毒性等级都为1级, 具有良好的体外生物相容性。

关键词 金属材料, 含铜钴铬合金, 细胞毒性, 细胞增殖, 细胞凋亡, 生物相容性

分类号 TG146 文章编号 1005-3093(2015)08-0627-07

In Vitro Biocompatibility of Co-Cr Alloys with Different Content of Copper

ZHAO Xin[1,2,3,4] CAO Yang[1,2,3] YIN Zhun[1,2,3] ZHANG Guangping[5] REN Yibin[6]
ZHAN Desong[1,2,3,4*]

1. Department of Prosthetics, School of Stomatology, China Medical University, Shenyang 110002, China
2. Central Laboratory, School of Stomatology, China Medical University, Shenyang 110002, China
3. Liaoning Institute of Dental Research, Shenyang 110002, China
4. Liaoning Province Ord Diseases Translational Medicine Research Center, Shenyang 110002, China
5. Department of Stomatology, Sheng Jing Hospital of China Medical University, Shenyang 110011, China
6. Institute of Metal Research, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China

Manuscript received December 31, 2014; in revised form April 14, 2015.

*To whom correspondence should be addressed, Tel: (024)22894863, E-mail: zhandesong@126.com

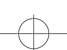
ABSTRACT The in vitro biocompatibility (i.e. the cell proliferation and apoptosis of L929 cells) of 4 cast dental alloys (CoCrMo+1%Cu, CoCrMo+2%Cu, CoCrMo+3%Cu and CoCrMo) were evaluated by CCK-8 and Annexing-V/PI double marking methods to provide a biology reference in the clinical application of prosthodontics. Results show that the in vitro biocompatibility of 4 alloys decreases according to following sequence: CoCrMo+1%Cu, CoCrMo+2%Cu, CoCrMo and CoCrMo+3%Cu. However, the cytotoxicity grades of the 4 alloys are all ranked in level one, implying they are good enough in vitro biocompatibility.

KEY WORDS metallic materials, copper-cobalt-chromium alloy, cytotoxicity, cellproliferation, apoptosis, biocompatibility

钴铬合金广泛应用于口腔固定和活动支架修复, 目前使用的口腔修复类材料主要有全瓷、贵金属合金、非贵金属合金。但是全瓷和贵金属合金的价格过于昂贵, 限制了其在国内的应用。镍铬合金因含镍元素而有潜在的细胞毒性作用, 且其生物相容性较差[1]; 钴铬合金不含镍元素, 且铬元素的含量较高, 具有良好的耐腐蚀性[2], 成为国内广泛应用的口腔修复材料。

但是, 用于口腔内的金属材料不同程度的腐蚀导致其表面特性改变, 使致病菌易于附着在表面。钴铬合金烤瓷冠对牙周组织具有明显的细菌易感性[3], 钴铬合金支架易引起承托区粘膜微生物的积累[4]。

2014年12月31日收到初稿; 2015年4月14日收到修改稿。
本文联系人: 战德松, 教授



近年来, 铜作为抗菌金属逐渐引起了人们的关注。Chai等[5]证明, 含铜317L不锈钢对种植相关感染疾病有较好的抗菌作用; 张丹等[6]在304不锈钢中加入一定量铜抑制了正畸矫治器周围粘膜微生物的堆积。铜离子的抗菌性能及细胞外毒性具有浓度依赖性[7]。本文使用中国科学院金属研究所研发的含铜钴铬合金, 研究不同铜含量钴铬合金对L929细胞增殖及凋亡的影响。

1 实验方法

L929细胞株由中国医科大学中心实验室提供。实验用试剂及仪器: RPMI1640培养基(Hyclone, 美国), 胎牛血清(Hyclone, 美国), CCK8试剂盒(同仁, 日本), Annexin-V/PI试剂盒(欣博盛, 北京), HERAcell 150细胞培养箱(Thermo Scientific, 美国), TDZ5-WS高速离心机(湘仪离心机仪器有限公司, 中国), TE2000-S倒置相差显微镜(Nikon, 日本), Infinite 200酶标仪(TECAN, 瑞士), 流式细胞仪(BD, 美国)。

实验组合金包括: 钴铬合金(Stellite, 上海)、含1%、2%、3%含量铜的钴铬合金(中国科学院金属研究所), 具体合金分组及成分列于表1。

阴性对照组为含10%胎牛血清的RPMI1640培养液, 阳性对照组为含10%DMSO的RPMI1640培养液, 分别用各合金浸提液或培养液与L929细胞共培养。

合金浸提液的制备: 将4种合金铸造成尺寸为15 mm×15 mm×1 mm的长方体金属块, 用砂纸打磨抛光至0.010 mm, 乙醇浸泡15 min脱脂后用超声清洗15 min, 再用去离子水充分冲洗后干燥, 在121℃高压灭菌1 h后于超净台中将其置于6孔板, 按ISO-10993标准确定试件表面积: 培养液体积为3 cm^2/mL, 分别向各组加入相应体积培养液, 在37℃、体积分数5% CO_2的培养箱中连续浸提72 h后收集至玻璃瓶中, 在4℃保存待用。

CCK-8检测细胞毒性和细胞形态学观察: 将处于对数生长期的L929细胞制备成单细胞悬液, 接种于3张96孔板。每板分为钴铬合金组(A组)、含1%含量铜的钴铬合金组(B组)、含2%含量铜的钴铬合金组(C组)、含3%含量铜的钴铬合金组(D组)、阴性对照组(E组)、阳性对照组(F组)以及空白对照组(G组)。每组设6个复孔, 在每孔内均加入细胞悬液100 μL, 在37℃、5%CO_2(体积分数)培养箱中静置培养24 h。待细胞贴壁后弃原培养液, 在每组中加入相应金属浸提液或培养液100 μL, 分别在培养箱中继续培养24、48、72 h后在倒置相差显微镜下观察。然后在每孔加入CCK-8试剂10 μL, 在避光条件下微震荡, 继续在37℃、5%CO_2条件培养2 h后用酶标仪检测OD值。计算细胞相对增殖率(relative growth rate, RGR), 按ISO-10993标准评价细胞毒性等级, 计算式为RGR(%)=(实验组OD值-空白组OD值)/(阴性对照组OD值-空白组OD值)×100%。

表1 实验用合金分组及其主要成分

Table 1 Main compositions of experimental alloys (mass fraction,%)

No.	Materials	Main composition
A	CoCrMo	Co 56.04, Cr 22.83, Mo 1.09
B	CoCrMo+1%Cu	Co 60.21, Cr 26.62, Mo 6.15, Cu 1.24
C	CoCrMo+2%Cu	Co 64.65, Cr 27.25, Mo 6.00, Cu 2.10
D	CoCrMo+3%Cu	Co 62.23, Cr 28.62, Mo 6.27, Cu 2.88

Annexin-V/PI双染标记检测细胞凋亡: 将处于生长对数期的L929细胞消化、重悬、进行细胞计数后接种于6孔板中, 分为钴铬合金组(A组)、含1%含量铜的钴铬合金组(B组)、含2%含量铜的钴铬合金组(C组)、含3%含量铜的钴铬合金组(D组)、阴性对照组(E组), 静置于37℃、5%CO_2(体积分数)培养箱中培养24 h。待细胞贴壁后弃去原培养液, 在每孔加入相应相同体积的金属浸提液或培养液, 继续培养48 h后弃各孔浸提液或培养液, 用不含EDTA的0.25%胰蛋白酶消化细胞, 冷PBS吹打重悬细胞, 4℃、1000 r/min离心10 min, 然后弃上清液。重复2次, 用200 μL缓冲液重悬各组细胞, 加入10 μL Annexin V和5 μL PI, 轻轻混匀后在避光条件下室温反应15 min。然后加300 μL缓冲液, 在1 h内用流式细胞仪检测。重复3次。

统计学分析: 是用SPSS17.0软件对数据进行统计学处理, 采用独立样本t检验分析, P<0.05为差异具有统计学意义, 所有计量资料以$\bar{x}\pm s$表示。

2 结果和讨论

2.1 各时间点细胞的形态和细胞毒性

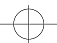
铸造合金在培养液中释放的金属离子作用于细胞时会产生不同的生物学反应, 而观察细胞形态是最直观地检测细胞毒性的方法。本文使用的L929细胞为小鼠成纤维细胞, 是ISO-10993标准推荐的用于细胞毒性实验的标准细胞, 具有高灵敏度、繁殖迅速、易培养等优点, 且在金属的细胞毒性反应方面与牙龈成纤维细胞相似。

由图1可见, 在24 h、48 h、72 h三个时间点上含1%、2%、3%含量铜的钴铬合金和钴铬合金都表现出良好的细胞形态, 各实验组细胞均形态正常、呈长梭

(A)
(B)
(C)
(D)
(E)
(F)
(24 h) (48 h) (72 h)

图1 各组细胞在各时间点的细胞形态

Fig.1 Cell morphology at each time points (A) CoCrMo group; (B) CoCrMo+1%Cu group; (C) CoCrMo+2%Cu group; (D) CoCrMo+3%Cu group; (E) negative control group; (F) positive control group



形, 贴壁生长良好, 在胞浆内可见离散颗粒, 无细胞溶解, 与阴性组正常细胞相比无太大的差别; 而在阳性对照组, 可见大部分细胞溶解或呈空泡中毒状态。细胞毒性的检测结果(见表2)也证实, 各实验组金属的毒性等级都为1级, 具有良好的生物相容性。

在决定一种铸造合金生物相容性的诸多因素中, 耐腐蚀性是至关重要的。耐腐蚀性影响合金中金属离子析出成分, 对周围组织产生不良影响[8]。而影响合金耐腐蚀性的因素有多种, 如合金成分、表面形态、浸提介质、浸提时间、温度、pH值等[9]。

本实验中对照组的钴铬合金为已广泛应用于临床的具有良好生物相容性的合金, 其主要成分为钴(Co)、铬(Cr)、钼(Mo), 其中Cr和Mo都促进合金稳定的钝化氧化层的形成, 使其具有良好的耐腐蚀性。在实验组分别向钴铬合金中加入了不同含量的铜元素, 实验结果证明其细胞毒性等级与钴铬合金相比无太大差异, 说明作为氧化还原反应催化剂的铜低浓度时对钴铬合金的耐腐蚀性能没有太大的影响。另外, 实验中用含10%胎牛血清的RPMI1640培养液作为浸提介质, 其主要成分为在平衡盐溶液的基础上添加了各种氨基酸、维生素及与血清中浓度相似的营养物质, 可模拟体内无机成分和有机物质对合金腐蚀性能的影响。但是根据ISO-10993标准推荐, 合金表面积与浸提液体积之比在0.5−6.0 cm^2/mL之间都可用于细胞毒性检测实验[10]。因此应该考虑不同的浸提比例对实验结果产生的影响, 本文用3 cm^2/mL的浸提比例发现各组合金都具有良好的生物相容性。

2.2 CCK-8检测细胞活性

CCK-8法检测细胞活性的基本原理: 该试剂含有WST, 即[22(22甲氧基)232(42硝基苯)252(2, 42二硫苯)22H2四唑一钠盐], 它在电子载体的作用下被线粒体中的乳酸脱氢酶还原为一种具有高度水溶性的黄色甲臜物质, 生成的甲臜数量与活细胞的数量成正比, 用酶标仪检测各溶液的吸光度(Absorption value, A)值即可分析细胞活性的大小。相比于传统的MTT法, CCK-8法更为简便、准确、重复性高, 广泛应用于国外的检测细胞增殖及毒性[6]。具体各组吸光度值列于表3。

由表3可见, 随着培养时间的延长各组细胞的A值都逐渐增大; 在每个时间点, A值都按阴性对照、含1%含量铜的钴铬合金、含2%含量铜的钴铬合金、钴铬合金、含3%含量铜的钴铬合金、阳性对照的顺序依次降低; 在第48 h时含3%含量铜的钴铬合金的A值明显低于阴性对照, 差异有统计学意义(P=0.020<0.05); 在第72 h时含3%含量铜的钴铬合金的A值明显低于阴性对照(P=0.025<0.05)和含1%含量铜的钴铬合金(P=0.008<0.05), 且含1%含量铜的钴铬合金的A值明显高于钴铬合金, 差异均有统计学意义; 阳性对照组在三个时间点的A值都明显低于其它各组(P<0.05), 呈现出明显的细胞毒性。这些结果表明, 在满足细胞毒性等级的基础上含1%、2%含量铜的钴铬合金相比于含3%含量铜的钴铬合金及钴铬合金具有更好的生物相容性。

有关铜的细胞毒性及抗菌性能具有浓度依赖性这一特点, 早已引起了人们的关注。有研究发现, 铜相比于其它抗菌金属所需的抗菌浓度比对细胞产生毒性的浓度低[11]。因此, 如果将合金中的铜含量控制在一定范围内, 便可在其发挥抗菌作用的同时保证具有良好的生物相容性。铜作为机体所必须的一种微量元素, 是体内多种酶类及蛋白质的重要组成部分, 参与其活化, 促进细胞的生长。人体每日所需铜元素的摄入量为2.9 mg左右, 维持在此浓度范围内的铜对人体产生有益的作用。Xie等[12]发现, 铜离子在培养液中的浓度在5 μmol/L左右时可促进血管内皮细胞的增长; 另有学者[13]证实, 将培养液中铜离子浓度控制在10 μmol/L以内对细胞的活性没有影响, 这也是本实验中相对铜离子浓度较低的组别却呈现出较高的细胞活性的原因。但是本实验也发现, 从第48 h开始 含3%含量铜的钴

表2 4组合金对L929细胞的相对增殖率和细胞毒性等级

Table 2 The cell RGR and cytotoxicity grades of 4 kinds of alloys to L929

Group	24 h		48 h		72 h	
	RGR	Level	RGR	Level	RGR	Level
CoCrMo	82.40%	1	81.04%	1	84.21%	1
CoCrMo+1%Cu	95.09%	1	95.30%	1	96.74%	1
CoCrMo+2%Cu	86.41%	1	91.09%	1	94.88%	1
CoCrMo+3%Cu	80.93%	1	80.04%	1	82.40%	1
Positive control group	37.15%	3	37.65%	3	37.09%	3

铬合金组最早表现出了细胞活性下降的趋势, 直到第72 h含3%含量铜的钴铬合金组的细胞活性要显著低于含1%含量铜的钴铬合金组与阴性对照组。这说明, 随着铜离子浓度的增高及培养时间的延长铜离子开始抑制细胞增殖象。虽然还缺少具体的离子浓度分析, 但是可以肯定含1%、2%含量铜的钴铬合金的细胞毒性小于含3%含量铜的钴铬合金与钴铬合金。

2.3 Annexin-V/PI检测细胞凋亡

细胞凋亡, 又称细胞的程序性死亡, 是由基因控制的细胞自主性死亡的现象, 是维护内环境稳定的细胞主动死亡过程。Annexin-V/PI检测细胞凋亡的基本原理是: 在细胞发生凋亡早期膜磷脂酰丝氨酸(PS)由脂膜内侧翻向外侧, Annexin-V是一种磷脂结合蛋白, 与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力, 故可通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的胞膜结合。碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)是一种核酸染料, 不能透过完整的细胞膜, 但是对于凋亡中晚期的细胞和死细胞, 由于细胞膜通透性的增加, PI能透过细胞膜而使细胞核染红。因此可将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。

由图3可见, 各组细胞都以正常细胞和凋亡细胞为主, 每组的凋亡细胞分布不均。由表4可见, 各组的早期凋亡细胞比例按阴性对照组、含1%含量铜的钴铬合金组、含2%含量铜的钴铬合金组、钴铬合金组、含3%含量铜的钴铬合金组的顺序依次递增。

表3 不同培养时间点各组的吸光度值($\bar{x}\pm s$, n=6)

Table 3 Absorption value at different culture time points($\bar{x}\pm s$, n=6)

Groups	24 h	48 h	72 h
CoCrMo	0.4199 ± 0.0744	0.6862±0.0688	1.3627±0.0808
CoCrMo+1%Cu	0.4654 ± 0.0570	0.7850±0.1584	1.5469±0.0987^{b}
CoCrMo+2%Cu	0.4343±0.0513	0.7558±0.0476	1.5196±0.1596
CoCrMo+3%Cu	0.4147±0.0379	0.6793±0.0396^{a}	1.3360±0.0447^{a,c}
Negative control group	0.4830±0.0840	0.8175±0.0784	1.5947±0.1676
Positive control group	0.2578±0.0318^{a,b}	0.3856±0.0759^{a,b}	0.6701±0.0775^{a,b}

Notes: a: compared with negative control group, P<0.05; b: compared with CoCrMo group, P<0.05; c: compared with CoCrMo+1%Cu group, P<0.05.

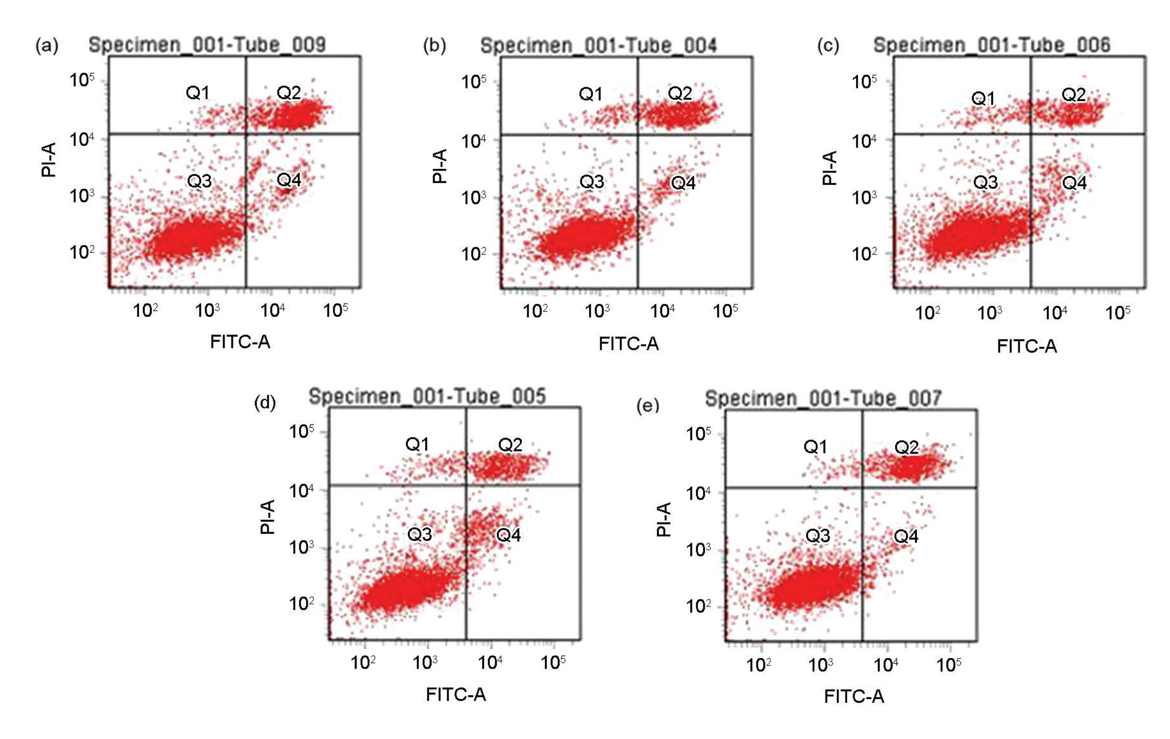


图3 各组细胞培养48 h后流式细胞仪检测早期凋亡率

Fig.3 Results of flow cytometry about early apoptosis after 48 h. (a) CoCrMo group; (b) CoCrMo+1%Cu group; (c) CoCrMo+2%Cu group; (d) CoCrMo+3%Cu group; (e) negative control group

表4 各组细胞48 h早期凋亡率($\bar{x} \pm s$, n=3)

Table 4 Early apoptosis rate of each group at 48 h($\bar{x} \pm s$, n=3)

Groups	Early apoptosis rate	P
CoCrMo	4.10±0.45	0.003[a]
CoCrMo+1%Cu	2.80±0.66	0.385[a] 0.027[b]
CoCrMo+2%Cu	3.33±0.38	0.039[a] 0.038[b]
CoCrMo+3%Cu	4.37±0.26	0.005[a] 0.427[b]
Negative control group	2.36±0.40	–

Notes: a: the P value when compared with negative control group; b: the P value when compared with CoCrMo group.

含1%含量铜的钴铬合金组的早期凋亡率与阴性对照组相比无统计学差异, 说明有良好的生物相容性; 含3%含量铜的钴铬合金组与钴铬合金组的早期凋亡率相比也无统计学差异, 说明此二者的生物相容性相当, 这也进一步证明了CCK-8实验的结果。

口腔内的修复体长期处于唾液、龈沟液、各种食物所影响的复杂的电解质环境中, 口腔内温度、pH值等的变化易引起合金的腐蚀, 导致金属离子的析出[14]。有研究表明, 细胞凋亡是金属离子引发细胞死亡的主要方式, 且具有浓度依赖性和时间依赖性, 线粒体途径是其引发细胞凋亡的主要途径[15]。本实验发现, 含3%含量铜的钴铬合金组的早期凋亡率高于其它各组合金, 可能说明合金中铜含量的提高促进了细胞的凋亡。高浓度铜离子可导致脾细胞、胸腺细胞、肝实质细胞的凋亡, 也已被证实[16, 17]。铜离子诱导的细胞凋亡的机制, 可能是铜离子抑制了细胞转录过程中DNA及RNA的复制, 也可能是铜抑制了具有抗细胞凋亡作用的转录因子NF-κB的活性。实验组的钴铬合金也表现出了较高的早期凋亡率, 说明钴离子的析出对细胞具有一定的毒性[18], 其原因可能是钴离子可以抑制细胞的氧化还原状态, 导致细胞活性下降。

3 结　论

四种合金的生物相容性, 按含1%含量铜的钴铬合金、含2%含量铜的钴铬合金、钴铬合金、含3%含量铜的钴铬合金组的顺序递减; 含1%、2%含量铜的钴铬合金相比于含3%含量铜的钴铬合金及钴铬合金具有相对较好的生物相容性, 其细胞毒性都为1级。

参 考 文 献

1 MA Qian, WU Fengming, Study of released metal ions of three kinds of dental casting alloys, Stomatology, **31**(1), 33(2011)
(马　骞, 吴凤鸣, 3种烤瓷铸造合金的离子析出研究, 口腔医学, **31**(1), 33(2011))

2 LU Dongmin, XIE Guangping, SHENG Meichun, WANG Zhonghua, The apoptosis of L-929 cells induced by four kinds of dental ceramic alloys, Shanxi Medical Journal, **38**(2), 131(2009)
(卢东民, 谢广平, 盛美春, 王忠华, 4种烤瓷合金材料诱导L929细胞凋亡的研究, 陕西医学杂志, **38**(2), 131(2009))

3 LI Hongyang, ZHONG Lifang, LIU Bing, CAI Hongdan, Influences of cobalt-chromium alloy versus silver-palladium alloy porcelain crown on periodontal tissues, Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, **17**(21), 3893(2013)
(李洪洋, 钟丽芳, 刘　兵, 蔡鸿丹, 钴铬合金及银钯合金烤瓷冠对牙周组织的影响, 中国组织工程研究, **17**(21), 3893(2013))

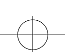
4 XU Fang, Quantitative Changes of Microflora on Stress-bearing Areas and Satisfaction Relating to Different Metal Base of Partial Denture, Master Thesis(Wenzhou, East China University of Science and Technology, 2013)
(徐　芳, 不同金属材料义齿基托对承托区口腔黏膜微生物、义齿性口炎影响, 硕士学位论文(温州, 华东理工大学, 2013))

5 H. Chai, L. Guo, X. Wang, Y. Fu, J. Guan, L. Tan, L. Ren, K. Yang, Antibacterial effect of 317L stainless steel contained copper in prevention of implant-related infection in vitro and in vivo, J. Mater. Sci. Mater. Med., **22**(11), 2525(2011)

6 KANG Xiaoyan, WEI Fang, ZHAN Desong, Cytotoxicity evaluation of the nickel-chromium ceramic alloy made by oneself, Chinese Journal of Practical Stomatology, **1**(8), 476(2008)
(康晓燕, 卫　芳, 战德松, 自制含钛镍铬烤瓷合金的细胞毒性评价, 中国实用口腔科杂志, **1**(8), 476(2008))

7 T. Kishimoto, Y. Fukuzawa, M. Abe, M. Hashimoto, M. Ohno, M. Tada, Injury to cultured human vascular endothelial cells by copper ($CuSO_4$) , Nihon. Eiseigaku. Zasshi., **47**(5), 965(1992)

8 YU Tianhao, ZHANG Ning, ZHAN Desong, Evaluation of biocom-



patibilities of three dental alloys by flow cytometry, Chin. J. Mater. Res., **27**(6), 652(2013)
(毓天昊, 张 宁, 战德松, 使用流式细胞仪评价3种牙科合金材料的生物相容性, 材料研究学报, **27**(6), 652(2013))

9 L. C. Rusu, C. M. Bortun, G. Tanasie, A. C. Podariu, F. Baderca, C. Solovan , L. Ardelean, The cytotoxicity of dental alloys studied on cell culture, Rom. J. Morphol. Embryol., **55**(1), 111(2014)

10 M. Čolić, R. Rudolf, D. Stamenković, I. Anžel, D. Vučević, M. Jenko, V. Lazić , G. Lojen, Relationship between microstructure, cytotoxicity and corrosion properties of a Cu-Al-Ni shape memory alloy, Acta Biomater., **6**(1), 308(2010)

11 R. K. Sani, B. M. Peyton, L. T. Brown, Copper-induced inhibition of growth of Desulfovibriodesulfuricans G20: assessment of its toxicity and correlation with those of zinc and lead , Appl. Environ. Microbiol., **67**(10), 4765(2001)

12 H. Xie, Y. J. Kang, Role of copper in angiogenesis and its medicinal implications, Curr. Med. Chem., **16**(10), 1304(2009)

13 S. Li, M. Wang, X. Chen, S. Li, J. L. Ling , H. Xie, Inhibition of osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by copper supplementation , Cell Proliferat., **47**(1), 81(2014)

14 C. A. Grillo, M. L. Morales, M. V. Mirifico , L. D. M. M. Fernandez, Synergistic cytotoxic effects of ions released by zinc-aluminum bronze and the metallic salts on osteoblastic cells, J. Biomed. Mater. Res. A, **101**(7), 2129(2013)

15 JIANG Lizhu, Induction of apoptosis in L929 murine fibroblasts in response to stainless steel which caps the magnetic attacbanent, Master Thesis(Shenyang, China Medical University, 2004)
(蒋立柱, 磁性附着体外包裹不锈钢材料对小鼠成纤维细胞L-929凋亡的影响, 硕士学位论文(沈阳, 中国医科大学, 2004))

16 T. Keswani, S. Mitra, A. Bhattacharyya: Copper-induced immunotoxicity involves cell cycle arrest and cell death in the liver, Environ. Toxicol., (2013)

17 S. Mitra, T. Keswani, M. Dey, S. Bhattacharya, S. Sarkar, S. Goswami, N. Ghosh, A. Dutta, A. Bhattacharyya: Copper-induced immunotoxicity involves cell cycle arrest and cell death in the spleen and thymus, Toxicology, **293**(1-3), 78(2012)

18 R. G. Contreras, J. R. Vilchis, H. Sakagami, Y. Nakamura, Y. Nakamura, Y. Hibino, H. Nakajima, J. Shimada, Type of cell death induced by seven metals in cultured mouse osteoblastic cells, In Vivo, **24**(4), 507(2010)

